

## ノート

一般に MALDI マススペクトルは、イオン生成のしきい値よりも若干高いレーザーフルエンスで測定される。この条件では、イオン生成の確率が低いため、1回のレーザー照射で観測されるマススペクトルの信号対雑音比(5章 2.3)は、あまり大きくない。そのため、レーザー光を50~200回繰り返し照射し、マススペクトルを積算して、最終的な MALDI マススペクトルを得る。

### 10.2.3 レーザー脱離プルームの時間変化

試料表面にレーザーパルス照射して起こるイオンおよび中性分子の脱離は、真空方向へのジェット状の超音速膨張 (supersonic expansion) により進行する [38]。発生した直後の小さくて熱いプルーム (plume) は、非常に早く膨張する [49]。この過程は断熱膨張なので、プルームは急速に冷却される [38]。

脱離したイオンの初速度を計測するのは難しいが、一般に報告されている値は  $400 \sim 1200 \text{ m s}^{-1}$  の範囲である。初速度は、イオンの質量にはあまり依存しないが、マトリックスの種類 [33,36-38,46,50,51] や測定対象化合物の種類には大きく依存する。例えば、ペプチドとオリゴ糖の挙動は異なっている [51]。

平均的なイオン速度は分析種の分子量そのものには依存しないので、試料イオンの平均的な初期運動エネルギーは、質量に対してほぼ直線的な関係で大きくなる。そのため、高質量イオンは、イオンが加速される前に、すでに数十電子ボルトの並進エネルギーを持っている [33,41,50]。イオンの初速度は、イオン加速から得られる速度に加算されるので、連続引き出し (continuous extraction) を用いる飛行時間型 (TOF) 分析部では、特にリニアモードで操作される場合、分解能がかなり低下する原因となる。

**例** レーザーフラッシュ光写真でレーザー脱離プルームを連続して観察すると、その時間変化が分かりやすい [52,53]。図 10.5 に示したプルームは、パルス幅 100 ns の Er:YAG レーザー ( $2.94 \mu\text{m}$ ) を、グリセロールにパルス照射して発生したものである。ここでは、暗視野照明法による写真を得るために、フラッシュ光源として Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 発振幅 15 ns) のパルスを利用した。

### 10.2.4 MALDI におけるイオン生成

MALDI においてイオンが生成する場所と過程は極めて複雑であり、単一の過程として考えることは難しい [40]。マトリックスと分析種の混合溶液の pH を下げるとペプチドイオンの量が増加するので、すでに試料層で生成していた  $[\text{M}+\text{H}]^+$  イオンが脱

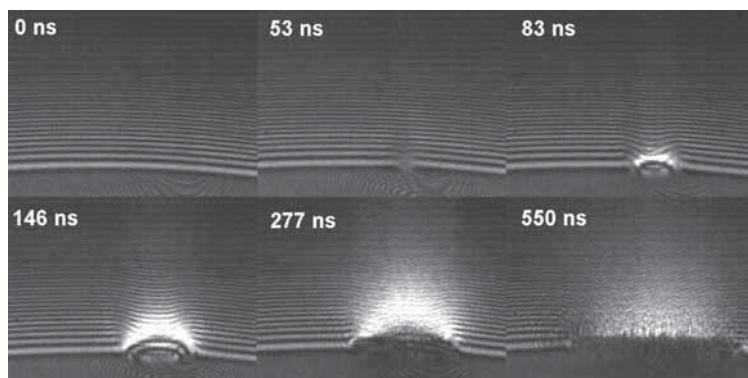


図 10.5 : パルス幅 100 ns の Er:YAG (2.94  $\mu\text{m}$ ) レーザーパルスによりグリセロールから生じたレーザー脱離プラズマの時間変化. F. Hillenkamp および A. Leiner, University of Münster の厚意による.

離しやすくなる. 同様の現象は, 化学構造中に酸素を多く含む試料を測定する場合に生成する  $[\text{M}+\text{alkali}]^+$  イオンなど, カチオン付加分子でも見られる. 一方, これらのイオン種は, 試料表面よりも数百  $\mu\text{m}$  ほど離れて発生する初期のプラズマブルーム中で生成する可能性も考えられることから [54,55], 気相過程の寄与も無視できない.

ペプチドやタンパク質 (イオン性の官能基を持つ) の脱離初速度は (質量によらず) 高いことが特徴的である. 一方, 最近の研究から, 中性のオリゴ糖や合成高分子 (これらの初速度はペプチドやタンパク質に比較して小さい) においては, 質量が大きくなるにつれ初速度が徐々に増加し, 最終的にはペプチドやタンパク質のレベルに到達することがわかった. また, 誘導体化でイオン性の官能基を導入すると, 小さなオリゴ糖でも高い初速度となることがわかった. このことは, 一般的には試料分子はマトリックス結晶に取り込まれている必要があり, 気相でのカチオン付加は小さな中性分子に対して起こり得ることを示している [38].

カルボキシル基をもたない化合物をマトリックスに用いて, 若干塩基性をもつペプチドなどの分子をプロトン付加させる場合, カルボキシル基からのプロトン供与は起こらないので, 励起状態のマトリックス分子が関与するプロトン移動反応も検討しなければならない [55,56]. UV 吸収性の試料では, 直接, 光イオン化が起こる可能性がある. このイオン化では, 正および負のラジカルイオン  $\text{M}^{+\bullet}$  [57,58] と  $\text{M}^{-\bullet}$  [59-61] が通常観測され, これらは電子の除去や捕獲によってのみ生成する. すなわち,  $\text{M}^{+\bullet}$  および  $\text{M}^{-\bullet}$  イオンの生成は, 光イオン化 [57] とともに, 気相での電荷交換および電子捕獲が起こることを示している [57,62]. 上記の過程のどれがイオン生成に最も重要な役割を果たすのかは, マトリックス, 試料, さらには実際に共存する添加剤や夾雑物の組み合わせに依存している.

## 10.3 MALDI マトリックス

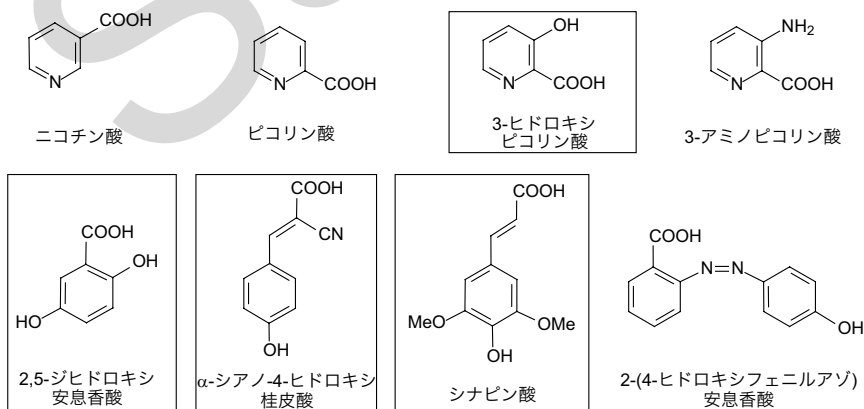
### 10.3.1 固体マトリックスの役割

MALDI 測定におけるマトリックスの役割は、FAB (9章 3.1) の場合と似ている。しかし、MALDI 用のマトリックスは、高真空のイオン源内で酸化しないように、一般に蒸気圧が低い結晶性の固体が用いられるという点で、FAB 用のマトリックスとは異なっている。しかも、FAB では基本的にどのような液体でもマトリックスになり得るのに対し、MALDI 用のマトリックスは、測定で使用される波長のレーザー光を吸収する必要がある [63]。また、UV-MALDI では、光エネルギーの強い吸収によってマトリックスを電子励起するので、マトリックス分子は適当な発色団を有していなければならない。そのため、ほとんどの UV-MALDI 用のマトリックス分子は、適度に化学修飾された芳香族化合物の構造を持っている。

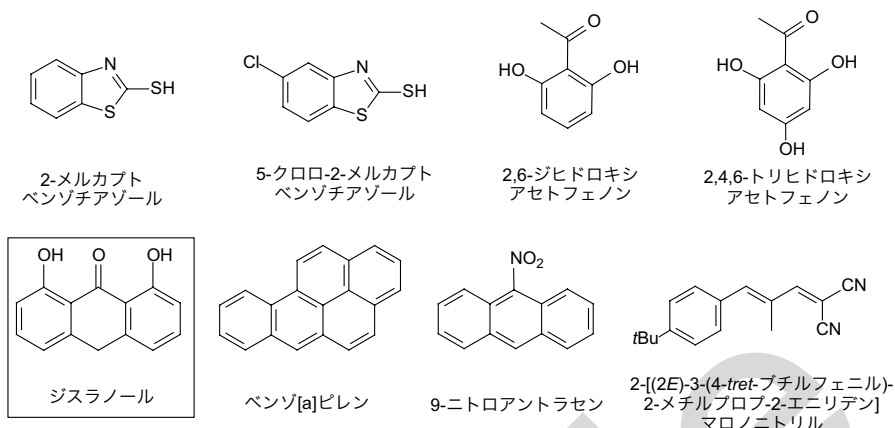
IR-MALDI の場合、 $3\ \mu\text{m}$  付近の波長は O-H と N-H 伸縮振動によって効率よく吸収され、また  $10\ \mu\text{m}$  付近の波長は、C-O 伸縮と O-H 変角振動の励起を引き起こすので、UV-MALDI 用のマトリックスと比べて制限が少ない [29,32]。そのため、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、尿素、およびグリセロールが IR-MALDI におけるマトリックスとしてよく用いられる [25,26]。マトリックス分子は、プロトン付加や脱プロトン化剤、または電子供与や電子受容体として働く。

### 10.3.2 UV-MALDI におけるマトリックス

ニコチン酸 (NA) は、ペプチドやタンパク質の UV-MALDI 用のマトリックスとして利用された最初の有機化合物であった [12-14]。それ以来、より良いマトリックスの探索が進められ、現在では、Scheme 10.1 と表 10.1 にまとめた化合物がマトリックスとして広く用いられている。



Scheme 10.1 (次ページへ続く)



Scheme 10.1 (続き)

C<sub>60</sub> フラーレン [88] とポルフィリン [89] もマトリックスとして用いられることがある。液体マトリックスは、その特長を生かした特殊な用途か、磁場セクター型装置を用いた MALDI 測定 [90,91] で、持続した信号を得るために試料表面を自己再生させる目的に利用されている。

新しい測定を行うときに用いるマトリックスの選択は、Scheme 10.1 および表 10.1 にまとめた中から検討することを勧める。枠で強調されたものは最もよく用いられるマトリックスである。一般に、高極性の分析種には高極性のマトリックスが効果的であり、非極性の分析種には非極性のマトリックスを組み合わせるのが望ましい。ただし、分析種によっては特定のマトリックスと組み合わせないと、良好な MALDI マススペクトルが得られないこともある。

#### ノート

マトリックスの呼び名は、化合物名よりも、略号を用いることが多い。しかし、その略号は統一されているわけではない。例えば、 $\alpha$ -CHC、 $\alpha$ -CHCA、4-HCCA、および CCA は、すべて  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を指している。他にも、ニコチン酸 (NA) と 9-ニトロアントラセン (9-NA) などは、混乱しやすい。

### 10.3.3 MALDI マトリックスのマススペクトルの特徴

MALDI マトリックスのマススペクトルでは、分子イオン、プロトン付加分子、カチオン付加分子、ないしは脱プロトン化分子などの強いピークと共に、一連のマトリックス (Ma) クラスターイオンや、かなり多くのフラグメントイオンが観測されるとい